

## 来氟米特对家兔动脉粥样硬化形成的影响

颜彦<sup>1</sup>, 王翔飞<sup>1</sup>, 张庆勇<sup>1</sup>, 崔杰峰<sup>2</sup>, 王 颢<sup>3</sup>, 朱文青<sup>1</sup>, 钱菊英<sup>1</sup>, 葛均波<sup>1</sup>

(复旦大学附属中山医院 1. 心内科, 2. 肝癌研究所, 3. 复旦大学上海医学院解剖学教研室, 上海市 200032)

[关键词] 病理学与病理生理学; 来氟米特对动脉粥样硬化形成的影响; 免疫组织化学; 来氟米特; 动脉粥样硬化; 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; 白介素介素 6

[摘要] 目的 研究免疫抑制剂来氟米特对兔动脉粥样硬化形成的影响。方法 24 只新西兰大白兔随机分为三组: 正常饮食组、高脂饮食组和高脂饮食+ 来氟米特治疗组。在 0 周和 8 周时测定血清中血脂、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白介素介素 6 浓度。免疫组织化学染色测定斑块处巨噬细胞数量。图像分析观察主动脉斑块/内膜面积比。结果 来氟米特对血脂无明显影响, 但可使肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白介素介素 6、主动脉斑块/内膜面积比及斑块处的巨噬细胞数较高脂饮食组显著降低( $P$  均 $< 0.001$ )。结论 来氟米特可显著抑制动脉粥样硬化部位的炎症反应, 对兔动脉粥样硬化有预防作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effects of Leflunomide on Experimental Atherogenesis of Rabbits

YAN Yan<sup>1</sup>, WANG Xiang-Fei<sup>1</sup>, ZHANG Qir-Yong<sup>1</sup>, CUI Jie-Feng<sup>2</sup>, WANG Jie<sup>3</sup>, ZHU Wen-Qing<sup>1</sup>, QIAN Ju-Yin<sup>1</sup>, and GE Jun-Bo<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Medical Laboratory, Zhongshan Hospital; 3. Department of Anatomy, Shanghai Medical College; Fudan University, Shanghai 200032, China)

[KEY WORDS] Leflunomide; Atherosclerosis; Tumor Necrosis Factor $\alpha$ ; Interleukin 6; Macrophage; Inflammation

[ABSTRACT] Aim To access the effects of leflunomide on experimental atherogenesis of rabbits. Methods 24 New Zealand White rabbits were divided into three groups, 8 rabbits were selected as normal diet control group, 8 rabbits as high diet control, the others as treatment group administered with leflunomide (5 mg/d). Serum lipids, interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), atherosclerotic plaque/intima size ratio of aorta and the number of infiltrating macrophage in plaques were detected on the 0, 8 th week. Results Leflunomide had no effect on the lipids compared with control groups, the level of circulating TNF- $\alpha$ , IL-6, plaque/intima size ratio and the number of infiltrating macrophage in the treatment group was lower than that of control groups (all  $P < 0.001$ ).

Conclusions LEF could inhibit the inflammation in the lesion of atherosclerosis of rabbits and attenuate atherogenesis of rabbits.

动脉粥样硬化是以脂质与纤维成分在大动脉壁沉积为特征的慢性进行性病变, 目前对动脉粥样硬化的发病机制尚未完全明了, 但普遍认为动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病<sup>[1-4]</sup>。在粥样硬化病变部位有巨噬细胞、T 淋巴细胞等许多免疫细胞的存在。此外, 自身免疫性疾病如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)等动脉粥样硬化的发生率明显增高<sup>[5-7]</sup>, 提示动脉粥样硬化与免疫反应有关, 推测动脉粥样硬化为一种免疫介导的全身性慢性炎症性疾病。来氟米特(leflunomide, LEF)是一种二氢乳清酸脱氢酶抑制剂, 阻断细胞嘧啶的合成, 具有免疫抑制及抗炎作用<sup>[8]</sup>, 现已被广泛用于类风湿性关节炎、SLE 等风湿性疾病的治

疗。因其具有明显的抗炎及免疫抑制作用, 本研究旨在评估其对家兔动脉粥样硬化形成的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 动脉粥样硬化模型的建立和分组

24 只雄性新西兰大白兔, 体重为 2.0~2.5 kg, 购自中国科学院药物研究所动物实验中心。随机分为正常饮食组、高脂饮食组和高脂饮食+ 来氟米特组, 每组 8 只。高脂饮食组给予高脂饲料(0.5% 胆固醇、5% 猪油、15% 蛋黄粉) 100 g/d, 高脂饮食+ 来氟米特组在高脂饲料中加入来氟米特(美国欣凯公司, 批号 X20000550) 5 mg/d。

#### 1.2 血脂、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白介素介素 6 浓度测定

实验前及处死动物前分别采集静脉血, 按照试剂盒说明方法(试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司)测定血清甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇

[收稿日期] 2004-10-13 [修回日期] 2005-05-18

[作者简介] 颜彦, 博士, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化和心律失常, E-mail 为 jackyan00@hotmail.com。王翔飞, 博士, 研究方向为药物洗脱支架。张庆勇, 博士, 研究方向为心肌预适应。

(high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC)。酶联免疫吸附法测定血清肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和白介素 6 (interleukin 6, IL-6) 水平 (试剂盒购自美国 LIFEKEY 公司)。

### 1.3 病理图像分析

用氯胺酮 (35 mg/kg)、安定 (5 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 空气注射处死。剖开胸腹腔, 从主动脉根部游离至髂动脉水平, 剥离外膜脂肪组织, 将主动脉置于 4% 多聚甲醛 (PBS, pH7.4) 中保存。切取自降主动脉起始向下 0.5 cm, 制成 4  $\mu$ m 厚的病理切片, 行免疫组织化学染色, 其余主动脉段纵行剖开, 行苏丹 Ⅳ 染色, 运用 LEICA DC300F 图像分析系统测定斑块总面积、内膜总面积及斑块/内膜总面积比。

### 1.4 免疫组织化学染色

抗巨噬细胞抗体购自美国 DAKO 公司; 二抗为即用型抗体, 购自美国抗体诊断公司, 按照产品介绍进行操作。动脉粥样硬化病变处的巨噬细胞将被染成暗褐色, 计数 25 个视野平均巨噬细胞数量 (选取

5 张切片, 每张切片观察 5 个随机高倍视野)。

### 1.5 统计学方法

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较用  $t$  检验, 多组间比较用 One-Way ANOVA 分析, 组内比较用 Tukey HSD 方法。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血脂变化情况

高脂饮食组和来氟米特治疗组 8 周时的 TG、TC 和 LDLC 水平均显著升高 ( $P < 0.001$ ), 但两组间并无明显差异。0 周和 8 周时各组之间 HDLC 水平无明显变化 (表 1, Table 1)。

### 2.2 炎症因子变化情况

实验前各组 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平无明显差异。高脂饮食组 8 周时 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平显著升高 ( $P < 0.001$ )。来氟米特治疗组 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平虽然稍高于正常饮食组, 但是显著低于高脂饮食组 (表 1, Table 1)。

表 1. 血清中血脂和炎症因子变化 ( $n = 5$ )

Table 1. Lipids and inflammatory factors in the blood

指标	0 周			8 周		
	正常对照组	高脂饮食组	来氟米特治疗组	正常对照组	高脂饮食组	来氟米特治疗组
TC (mmol/L)	1.18 $\pm$ 0.11	1.21 $\pm$ 0.06	1.22 $\pm$ 0.27	1.23 $\pm$ 0.30	29.40 $\pm$ 1.20 <sup>a</sup>	27.35 $\pm$ 2.23 <sup>a</sup>
LDLC (mmol/L)	0.14 $\pm$ 0.07	0.12 $\pm$ 0.05	0.14 $\pm$ 0.05	0.15 $\pm$ 0.02	21.81 $\pm$ 1.22 <sup>a</sup>	22.42 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
HDLC (mmol/L)	0.91 $\pm$ 0.08	1.02 $\pm$ 0.01	0.97 $\pm$ 0.01	0.93 $\pm$ 0.03	1.07 $\pm$ 0.02	0.96 $\pm$ 0.04
TG (mmol/L)	0.36 $\pm$ 0.17	0.35 $\pm$ 0.06	0.36 $\pm$ 0.07	0.38 $\pm$ 0.20	1.81 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	1.80 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$ (ng/L)	0.06 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>
IL-6 (ng/L)	0.08 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.02	0.42 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.18 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>

a:  $P < 0.001$ , 与正常对照组相比; b:  $P < 0.001$ , 与高脂饮食组相比。

### 2.3 动脉粥样斑块

正常对照组无肉眼可见斑块, 高脂饮食组均可见明显的粥样斑块, 来氟米特治疗组也可见少量粥样斑块。图像分析发现, 高脂饮食组斑块总面积显著高于正常饮食组和来氟米特治疗组 ( $P < 0.001$ ), 斑块/内膜面积比也有相似结果 (表 2, Table 2)。

### 2.4 巨噬细胞数量

正常饮食组未见明显阳性细胞。高脂饮食组内膜处巨噬细胞染色呈现强阳性。来氟米特治疗组染色阳性细胞数量较高脂饮食组显著减少 ( $P < 0.01$ )。见表 2 和图 1 (Table 2 and Figure 1)。

表 2. 兔主动脉病理学检查结果 ( $n = 5$ )

Table 2. Histological analysis of the aorta of rabbit

分组	内膜总面积 (mm <sup>2</sup> )	斑块面积 (mm <sup>2</sup> )	斑块/内膜面积比	巨噬细胞数 ( $\times 200$ )
正常对照组	1562.5 $\pm$ 155.3	0	0	0
高脂饮食组	1833.2 $\pm$ 180.1	943.6 $\pm$ 52.1	51.6% $\pm$ 9.8%	79.5 $\pm$ 12.4
来氟米特治疗组	1853.6 $\pm$ 172.5	617.8 $\pm$ 51.8 <sup>a</sup>	40.6% $\pm$ 7.3% <sup>b</sup>	31.2 $\pm$ 6.9 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.01$ , b:  $P < 0.001$ , 与高脂饮食组相比。

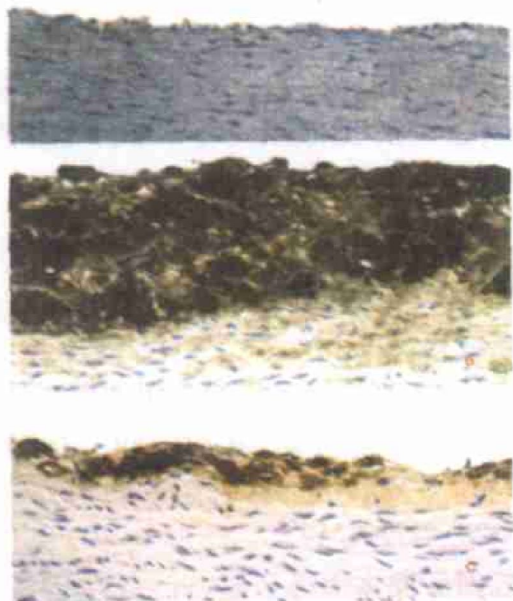


图 1. 兔主动脉抗巨噬细胞抗体染色 ( $\times 100$ ) A 为正常饮食组, B 为高脂饮食组, C 为来氟米特治疗组。

Figure 1. Macrophage in the aorta of rabbit

### 3 讨论

高脂饮食可以诱导兔主动脉发生粥样硬化病变, 伴随巨噬细胞浸润, 循环中的炎症因子 TNF- $\alpha$  及 IL-6 浓度升高, 来氟米特不仅可以显著减少兔主动脉粥样硬化斑块的面积, 也显著降低了巨噬细胞的浸润和 TNF- $\alpha$ 、IL-6 浓度, 提示来氟米特可能通过抑制炎症反应来减轻动脉粥样硬化病变程度。

现已明确炎症在动脉粥样硬化发生发展中发挥关键作用, 动脉粥样硬化的病理过程就是一种全身性的慢性炎症过程<sup>[1]</sup>。许多炎症因子(如 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等)均参与了炎症反应。但是, 目前对于动脉粥样硬化炎症反应的触发因素尚未完全清楚。免疫反应可能参与动脉粥样硬化的全过程<sup>[9, 10]</sup>, 甚至有人认为动脉粥样硬化就是一种自身免疫性疾病<sup>[11]</sup>。在自身免疫性疾病(如类风湿性关节炎、SLE)中, 动脉粥样硬化发生率显著增高<sup>[5, 6]</sup>, 且与传统的危险因素无关<sup>[7]</sup>, 糖皮质激素治疗后, 炎症和动脉粥样硬化均有减轻<sup>[12]</sup>, 越来越多的证据显示动脉粥样硬化与自身免疫性疾病有许多相似之处<sup>[1, 13]</sup>。因此, 人们尝

试将免疫抑制剂应用于动脉粥样硬化的治疗。来氟米特能够抑制机体内的细胞及体液免疫反应, 已广泛地用于类风湿性关节炎、SLE、移植后的排异反应的治疗<sup>[8, 14]</sup>, 我们将之应用于高脂饮食诱导的动脉粥样硬化的预防, 结果表明来氟米特能够减轻动脉粥样硬化程度, 浸润的巨噬细胞数量和循环中的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 炎症因子浓度也呈现下降趋势, 这个结果提示高脂饮食诱导的动脉粥样硬化可能是由免疫反应触发的全身性慢性炎症过程。

急性冠状动脉综合征时斑块处的炎症反应更为剧烈, 如果在常规的抗凝、抗血小板基础上使用来氟米特抑制炎症反应, 治疗效果可能会更好, 需要进一步的实验研究来证实。

### [参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [2] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 2002, **105** (9): 1135-143
- [3] Jianglin Fan, Teruo Watanabe. 炎症反应在动脉粥样硬化发病学中的作用. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (7): 706-708
- [4] 李后开, 戴敏. 内皮细胞炎症反应在动脉粥样硬化研究中的作用. 2004, **12** (5): 607-610
- [5] Wallberg-Jonsson S, Ohman ML, Dahlqvist SR. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with seropositive rheumatoid arthritis in Northern Sweden. *J Rheumatol*, 1997, **24** (3): 445-451
- [6] Jonsson H, Nived O, Sturfelt G. Outcome in systemic lupus erythematosus: a prospective study of patients from a defined population. *Medicine (Baltimore)*, 1989, **68** (3): 141-150
- [7] Roman MJ, Shanker BA, Davis A, Lockshin MD, Sammaritano L, Simantov R, et al. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*, 2003, **349** (25): 2399-406
- [8] Bartlett RR, Brendel S, Zielinski T, Schorlemmer HU. Leflunomide, an immunorestoring drug for the therapy of autoimmune disorders, especially rheumatoid arthritis. *Transplant Proc*, 1996, **28** (6): 3074-078
- [9] Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (12): 1876-890
- [10] Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res*, 2002, **1** (4): 281-291
- [11] Wick G, Perschinka H, Millonig G. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. *Trends Immunol*, 2001, **22** (12): 665-669
- [12] Caligiuri G, Liuzzo G, Biasucci LM, Maseri A. Immune system activation follows inflammation in unstable angina: pathogenetic implications. *J Am Coll Cardiol*, 1998, **32** (5): 1295-304
- [13] Pasceri V, Yeh ET. A tale of two diseases: atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Circulation*, 1999, **100** (21): 2124-126
- [14] Siemasko KF, Chong AS, Williams JW, Bremer EG, Finnegan A. Regulation of B cell function by the immunosuppressive agent leflunomide. *Transplantation*, 1996, **61** (4): 635-642

(此文编辑 文玉珊)